



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 19 096 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
A 61 L 27/32
A 61 L 27/36

⑳ Aktenzeichen: 101 19 096.4
㉔ Anmeldetag: 19. 4. 2001
㉕ Offenlegungstag: 24. 10. 2002

DE 101 19 096 A 1

- ⑦① **Anmelder:**
KERAMED Medizintechnik GmbH, 07646 Mörsdorf,
DE; Institut für Bioprozeß- und
Analysenmeßtechnik e.V., 37308 Heilbad
Heiligenstadt, DE; Surface & Interface Technologies
GmbH Rosenhof, 37308 Heilbad Heiligenstadt, DE
- ⑦④ **Vertreter:**
Abitz & Partner, 81679 München
- ⑦② **Erfinder:**
Liefeth, Klaus, Dr., 37318 Uder, DE; Rahm, Jens,
08412 Werdau, DE; Hildebrand, Gerhard, 37318
Lutter, DE; Glien, Wilfried, Dr., 07639 Bad
Klosterlausnitz, DE

⑥⑥ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:**

DE	199 47 263 A1
DE	197 06 667 A1
DE	195 08 753 A1
DE	100 06 992 A1
DE	42 42 889 A1
US	62 14 049 B1
US	61 13 993 A
US	59 58 430 A
EP	08 06 212 A1
EP	05 20 237 A1
WO	99 26 674 A2
WO	99 11 202 A1
WO	01 56 628 A1
WO	00 72 775 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ **Biologisch funktionalisierte, metabolisch induktive Implantatoberflächen**

⑤⑦ Die biologisch funktionalisierte und metabolisch induktive Beschichtung wird dadurch gebildet, daß auf eine offenporige Substratoberfläche eine oder mehrere kontrolliert resorbierbare Ca/P-Phase(n) kombiniert mit Adhäsions- und/oder Signalproteinen und/oder mit funktionellen Derivaten davon in einer Schichtdicke, welche die Offenporigkeit der Substratoberfläche im wesentlichen nicht beeinträchtigt, aufgebracht ist. Die offenporige Substratoberfläche kann durch eine Plasmaspritz-, Sinter- oder Gießtechnik hergestellt werden und kann eine plasmagespritzte Titanschicht (TPS) sein, die als Einschicht- bzw. Zweischichtsystem ausgebildet wurde. Die Ca/P-Schichten können ein Ca/P-Verhältnis von etwa 1,0 bis etwa 1,8 aufweisen.

DE 101 19 096 A 1

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Möglichkeiten der prothetischen Rehabilitation sowohl in der Oralmedizin als auch in der Orthopädie sind durch die Einbeziehung von Implantaten wesentlich erweitert worden.

[0002] Es läßt sich feststellen, daß die orale Implantologie bereits ein integraler Bestandteil der zahnärztlichen Therapie geworden ist. Hierzu hat auch die Anwendung verbesserter bzw. neuer Operationstechniken beigetragen, welche das Indikationsspektrum für implantatgetragenen Zahnersatz deutlich erweiterten. Nach Angaben des deutschen Zentrums für Orale Implantologie wurden allein in Deutschland im Jahr 1998 bereits 165.000 Implantationen von künstlichen Zähnen auf privater Basis vorgenommen. Derzeit vorliegende Prognosen für das nächste Jahrzehnt sprechen weltweit von einer starken Zunahme der Versorgung mit künstlichen Implantatsystemen in der Dentalmedizin. Die Dentalimplantate bestehen in aller Regel aus Titan, deren Oberflächen punktuell bzw. ganzheitlich mit speziellen Verfahren behandelt werden.

[0003] Im Bereich der orthopädischen und unfallchirurgischen Implantologie werden derzeit allein in Deutschland ca. 165.000 Hüftprothesen pro Jahr implantiert, wobei 5-8% der Patienten bereits nach 10 Jahren im wesentlichen aufgrund aseptischer Prothesenlockerungen wieder reimplantiert werden müssen. D. h., davon sind ca. 30.000 Operationen sogenannte Revisionen, die bei den Krankenkassen mit 17 TDM/Operation im Vergleich zu 14 TDM/Operation für eine Erstimplantation zu Buche schlagen.

[0004] Des weiteren stellen auch Implantat-induzierte Infektionen einen nicht unerheblichen Kosten- und Risikofaktor dar. So zeigt die von Malchau und Herberts (18), durchgeführte "Schweden-Studie" bezüglich des Revisionsrisikos nach 134.056 Primärimplantationen von Hüftgelenkprothesen, daß trotz der derzeit häufig angewendeten, prophylaktischen Antibiotika-Therapie (Gentamicingabe an den vorpräparierten Implantationsort) und anderer Maßnahmen zur Verhinderung tiefer Infektionen die Zahl der aus diesem Grund notwendigen Revisionen sich auf ca. 1% beläuft. Europaweit belaufen sich die Revisionsraten von Hüftendoprothesen im Bereich von 2-2,5%, wobei die septischen Lockerungen zur Revision der Implantate nach nur 1-2 Jahren Tragezeit führen. In diesem Zusammenhang beziffern Robertsson et al. (19) die Erstrevisionen im Bereich des totalen Knieersatzes (Schweden, 1988-1997) auf ca. 11%.

[0005] Trotz intensivster Anstrengungen im Bereich der Biomaterialforschung bzw. im Bereich der prothetischen Produktentwicklung muß somit festgestellt werden, daß die Implantologie bis heute nicht in der Lage ist, ein Biomaterial dauerhaft und absolut komplikationslos in den menschlichen Organismus zu integrieren. Die Ursache hierfür liegt in dem derzeit noch unzureichendem Verständnis über die ablaufenden, hochkomplexen Wechselwirkungsprozesse zwischen Materialoberflächen und biologischer Umgebung. In diesem Zusammenhang muß davon ausgegangen werden, daß auch für die avisierten Implantatsysteme im Hartgewebekontakt unterschiedliche Kriterien berücksichtigt werden müssen. Zu diesen zählen: Biokompatibilität, biomechanische Integrität und funktionelle Kraftverteilung in den umliegenden Knochen sowie die schnelle Einheilung unter Vermeidung Implantat-induzierter Infektionen und die langzeitstabile Gewährleistung eines optimalen Kontaktes der Implantatoberfläche zum umliegenden Knochengewebe.

[0006] Da die mechanische Integrität der eingesetzten Werkstoffe inzwischen weitestgehend sichergestellt werden

kann, treten die Anforderungen des biologischen Umfeldes mehr und mehr in den Vordergrund des Interesses. Dies bedeutet, daß Implantate in zunehmenden Maße nach dem Verbundwerkstoffkonzept entwickelt werden müssen, wobei die lasttragende Bulk Phase vorwiegend die geforderten biomechanischen Eigenschaften einbringt (Strukturkompatibilität) und die Oberflächenphase die Grenzflächenkompatibilität im Kontakt mit der umgebenden biologischen Phase gewährleistet.

Stand der Technik

[0007] Im Bereich des Hartgewebekontaktes (Hüft-, Knie-, Schulter- und Dental- und Wirbelsäulenimplantate sowie Nägel für die Traumatologie) wurde mit unterschiedlichsten Ansätzen (thermische Spritzverfahren einschließlich Plasmaspritzverfahren, elektrochemische Abscheidung, Sol-Gel-Technologien, Ionenstrahlputtern, Laserablation) versucht, das gewünschte Eigenschaftsspektrum durch die Beschichtung eines geeigneten metallischen Grundmaterials mit bioaktiven Komponenten wie Bioglas oder Hydroxylapatit (Hauptbestandteil der anorganischen Knochenphase) zu realisieren. Davon konnten sich kommerziell bisher nur das Plasmaspritzverfahren (1, 2) und die elektrochemische Abscheidung (2, 3, 4) etablieren.

[0008] Nach Auswertung der ersten klinischen Langzeituntersuchungen ist jedoch davon auszugehen, daß die bisher als langzeitstabil geltenden plasmagespritzten HAP-Schichten im biologischen Umgebungsmilieu einer partiellen Degradation unterliegen (5, 6). Infolgedessen kommt es einerseits zu unerwünschten Phasenänderungen an der Grenzfläche zum Biosystem, andererseits führt dieser Prozeß zum Abkapseln und/oder Abplatzen von vorwiegend kristallinen Schichtbestandteilen (Partikeln). Weiterhin gilt als gesichert, daß die initiale Haftfestigkeit in der Grenzfläche zwischen plasmagespritzter HAP-Schicht und metallischem Grundmaterial mit steigender Liegezeit der Implantate deutlich erniedrigt wird. Die abgelösten Partikel dieser an sich zwar knochengewebeähnlichen Materialien können zu langanhaltenden Fremdkörperreaktionen führen (7, 8), die die gewünschte Osteointegration des Implantates behindern und eine bereits erfolgte Knochenneubildung osteolytisch beeinflussen (5). Mithin kann von einer langzeitstabilen Verbindung zwischen Grundmaterial und Beschichtung nicht die Rede sein.

[0009] Demgegenüber wurde in ersten neueren Untersuchungen von Cooley (9) und Maxian (10) die vergleichsweise hohe Effizienz von vollständig degradierbaren, bioaktiven Schichten, die mittels elektrochemischer Verfahren auf metallischen Grundkörpern aufgebracht wurden, nachgewiesen. Die Auswertung von tierexperimentellen Studien führte zu der Schlußfolgerung, daß trotz der schnellen und vollständigen Degradation von hochlöslichen Ca/P-Schichten ein sicheres Knochenanwachsverhalten an die Implantatoberfläche gegeben ist. Nachdem solche elektrochemisch hergestellten, hochlöslichen Beschichtungen ausnahmslos einer chemischen Degradation ohne Partikelfreisetzung unterliegen, kann davon ausgegangen werden, daß der oben beschriebene "long-term risk"-Effekt, der an plasmagespritzten HAP-Schichten auf dentalen Implantaten bereits nach 4-jähriger Implantationsdauer klinisch nachgewiesen wurde, durch die Verwendung schnell degradierender Ca/P-Schichten grundsätzlich umgangen werden kann.

[0010] Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, daß die sich in der klinischen Anwendung befindlichen, hochlöslichen Ca/P-Beschichtungen des Standes der Technik langfristig deutlich bessere Ergebnisse als die bisher meistverwendeten plasmagespritzten HAP-Schichten ver-

sprechen. Trotzdem besteht nach wie vor Bedarf nach Implantaten mit verbesserten Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Osteointegration. Vor allem bei lasttragenden Implantaten ist hier trotz gewisser erzielter Fortschritte noch kein optimales Niveau erreicht worden.

[0011] Eingehende Untersuchungen der Erfinder führten zu dem Ergebnis, daß die jeweilige Oberflächengestaltung von ansonsten identischen Implantatoberflächen die Osteointegration weit stärker beeinflussen kann als bisher angenommen wurde. Insbesondere wurde festgestellt, daß im Vergleich zu herkömmlichen Implantaten, die entweder glatte oder leicht angeraute bzw. kleinporeige Oberflächen aufweisen, Implantatoberflächen mit relativ großen offenen Poren einen deutlich weitergehenden Knocheneinbau mit Vaskularisierung und eine bessere mechanische Verbindung zwischen Implantat und dem neugebildeten Knochengewebe ermöglichen. Dies gilt auch und bevorzugt bei Implantatoberflächen, die eine Beschichtung mit einer schnell resorbierbaren Ca/P-Phase aufweisen.

[0012] Darüber hinaus wurde erkannt, daß kontrolliert resorbierbare Ca/P-Schichten, welche auf einer offenporigen Grundstruktur hergestellt wurden, besonders effektiv mit Adhäsions- und oder Signalproteinen kombiniert werden können, um die sich beim Einheilungsprozeß eines Implantats natürlicherweise langsam bildende extrazelluläre Matrix auf der Implantatoberfläche biochemisch zu simulieren. Damit kann die Adhäsion von Osteoblasten und ihre Proliferation und knorpelgewebstypische Stoffwechselleistung (z. B. Kollagen Typ I- und Osteocalcin-Synthese, BCM-Produktion) stimuliert und die Osteointegration wesentlich beschleunigt werden.

[0013] Über die Aktivierung einzelner Zellfunktionen durch oberflächengebundene Signalproteine wurde in Experimenten an Modelloberflächen (Glas, Quarz, Polymer, Silicium, Metall, PMMA) berichtet (11, 12, 13). Die Kombination bestimmter Calciumphosphat-Substrate mit biologisch aktiven Proteinen wurde theoretisch ebenfalls in Betracht gezogen, jedoch ohne eine praktisch umsetzbare Lehre zu vermitteln (16). Alle diese herkömmlichen Materialien unterscheiden sich in ihren Oberflächeneigenschaften deutlich von den erfindungsgemäßen Mehrschichtsystemen (offenporige Substratoberfläche mit interkonnektierenden Porensystemen, die mit kontrolliert resorbierbaren Ca/P-Schichten versehen und biologisch funktionalisiert sind) bzw. der erfindungsgemäßen strukturierten metallischen Implantatoberfläche, in welche Ca und P sowie gegebenenfalls andere, dem biogenen Knochenapatit eigene Elemente direkt eingebracht wurden, und sind ihnen auch beim Einsatz als Implantatoberflächen unterlegen bzw. sogar dafür gänzlich ungeeignet.

[0014] Somit wird das Ziel einer dauerhafteren und schnelleren Osteointegration von Implantaten erfindungsgemäß durch biologisch funktionalisierte Beschichtungen mit den kennzeichnenden Merkmalen der vorliegenden Ansprüche 1 bzw. 16 gelöst.

[0015] Darüber hinaus kann dem eingangs erwähnten Gesichtspunkt der Vermeidung Implantat-induzierter Infektionen erfindungsgemäß dadurch Rechnung getragen werden, daß geeignete Arzneimittelwirkstoffe, z. B. Antibiotika, an die Implantatoberfläche gebunden und kontrolliert davon freigesetzt werden.

Beschreibung der Erfindung

[0016] Die vorliegende Erfindung stellt eine biologisch funktionalisierte Beschichtung bereit, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß auf eine offenporige Substratoberflä-

che eine oder mehrere kontrolliert resorbierbare Ca/P-Phase(n) kombiniert mit Adhäsions- und/oder Signalproteinen und/oder mit funktionellen Derivaten davon in einer Schichtdicke, welche die Offenporigkeit der Substratoberfläche im wesentlichen nicht beeinträchtigt, aufgebracht ist.

[0017] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine biologisch funktionalisierte Beschichtung bereit, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die Elemente Ca und P sowie gegebenenfalls andere, dem biogenen Knochenapatit eigene Elemente, wie z. B. Na, Mg, Si, F etc., direkt in eine strukturierte, metallische Implantatoberfläche eingebracht sind.

[0018] In einem weiteren Aspekt umfassen die biologisch funktionalisierten Beschichtungen der Erfindung ferner an die Implantatoberfläche gebundene Antibiotika und/oder andere Arzneimittelwirkstoffe, die kontrolliert davon freigesetzt werden können.

[0019] Ferner stellt die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Beschichtungen sowie deren Verwendung als Oberflächenbeschichtung von Implantaten, insbesondere im Hartgewebekontakt, bereit.

[0020] Die erfindungsgemäßen Beschichtungen sind "metabolisch induktiv", dies bedeutet im Kontext der vorliegenden Erfindung, daß sie die knorpelgewebstypische Stoffwechselleistung, z. B. Matrixproduktion von Kollagen Typ I und Osteocalcin und aktive Mineralisierung, stimulieren und/oder den primären Metabolismus (z. B. Atmungsaktivität und Energiegewinnung) relevanter Zellen wie Osteoblasten erhöhen können.

[0021] Für die vorliegende Erfindung geeignete offenporige Substratoberflächen können in Abhängigkeit vom verwendeten Substratmaterial mit verschiedenen bekannten Methoden des Standes der Technik, einschließlich Sintergieß- und Spritztechniken, hergestellt werden. Für metallische Substrate wie Titan, Titanlegierungen, z. B. TiAl₆V₄, andere Metallegierungen, z. B. CoCrMo-Legierungen, eignet sich besonders ein Verfahren, bei dem eine oder mehrere plasmagespritzte, korrosionschemisch optimierte Titanschichten (TPS) auf dem Grundkörper (Metall bzw. Metalllegierung) aufgebracht werden. Porengröße und Porenanteil der Schicht(en) lassen sich nach Wunsch einstellen.

[0022] Untersuchungen zum Einfluß der Porengröße auf das Einwachsverhalten haben ergeben, daß die minimale Porengröße für ein signifikantes Einwachsen von natürlichem Knochen in der Regel bei 75–100 µm liegen wird. Poren einer Größe von ca. 200 µm ermöglichen ein signifikantes Wachstum von Knochengewebe, das auch nach längerer Zeit noch anhält. Poren mit größeren Durchmessern als 500 µm führen nur zu einem unzureichenden Einwachsen von natürlichem Knochen. Untersuchungen zum Einfluß der Porosität auf das knorpelartige Einwachsverhalten zeigten darüber hinaus, daß Porositäten unter 15–20% zu keinem nennenswerten Einwachsverhalten führen. Porositäten über 50% ergeben wiederum nur ein unvollständiges Einwachsen von natürlichem Knochen.

[0023] Vorzugsweise hat deshalb mindestens die oberste Schicht einen Porenanteil von 15–40%, bevorzugter 20–35%, und weist offene, interkonnektierende Poren mit einem Durchmesser von ca. 75–300 µm, vorzugsweise 100–250 µm, insbesondere 150–200 µm, auf.

[0024] Kontrolliert resorbierbare Ca/P-Phasen, die für die biologisch funktionalisierte Beschichtung der vorliegenden Erfindung einsetzbar sind, lassen sich nach einem geeigneten Verfahren des Standes der Technik herstellen. Bevorzugt sind hierbei elektrochemisch abgeschiedene Ca/P-Phasen, wie z. B. in DE 44 31 862 (4) beschrieben, da sich hier über eine Variation der Prozeßparameter, z. B. Elektrolytzusammensetzung und -konzentration, Temperatur, Stromstärke

etc., die Schichtdicke, der Schichtaufbau, die Schichtzusammensetzung und andere Eigenschaften der Ca/P-Phasen reproduzierbar einstellen lassen. Insbesondere läßt sich auch das Ca/P-Verhältnis und der Grad der Kristallinität nach Wunsch einstellen. Im allgemeinen sind amorphe Schichten schneller resorbierbar als kristalline Schichten, so daß je nach der gewünschten Resorptionszeit gezielt eine Mischung von amorphen oder kristallinen Phasen hergestellt werden kann. Eine "amorphe Phase" im Kontext dieser Anmeldung kann auch einzelne nano- oder mikrokristalline Bereiche einschließen. Unterschiedliche Phasen können sowohl nebeneinander in einer Schicht vorliegen als auch in Schichten übereinander angeordnet sein. Die Gesamtschichtdicke darf nicht so hoch sein, daß die Offenporigkeit der darunterliegenden Substratoberfläche beeinträchtigt ist. Vorzugsweise beträgt die Gesamtschichtdicke 5–50 µm, besonders bevorzugt 10–20 µm.

[0025] Während das Ca/P-Verhältnis bei stöchiometrisch reinem Hydroxylapatit 1,67 beträgt und bei natürlichen Knochenmaterialien im Bereich von etwa 1,55 bis 1,63 liegt, eignen sich überraschenderweise Ca/P-Phasen mit deutlich niedrigeren Ca/P-Verhältnissen von etwa 1,0 bis etwa 1,5, vorzugsweise etwa 1,0, bis etwa 1,3, besonders gut zur Verwendung in den Beschichtungen der vorliegenden Erfindung. Allerdings schließt dies nicht aus, daß unter Umständen auch Ca/P-Phasen mit höheren Ca/P-Verhältnissen geeignet sein können. Vorzugsweise wird die Degradationskinetik der CaP-Beschichtung für unterschiedliche Knochenqualitäten (jüngere und ältere Patienten, verschiedene Implantationsorte) maßgeschneidert werden.

[0026] Darüber hinaus sollte die CaP-Schicht aus chemischer Sicht dem biogenen Knochenapatit möglichst angepaßt sein. Dies läßt sich durch eine Dotierung der CaP-Schicht mit Elementen des natürlichen Knochens, z. B. Na, Mg, Si, F etc., erreichen. Zelltoxisch wirkende Schicht- bzw. Phasenbestandteile, wie beispielsweise CaO (17), sind jedoch zu vermeiden.

[0027] Bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die offenporige Implantatoberfläche nicht mit einer CaP-Schicht wie oben ausgeführt bedeckt, sondern Ca und P sowie gegebenenfalls andere, dem biogenen Knochenapatit eigene Elemente (Na, Mg, Si, F etc.) werden direkt in die strukturierte metallische Implantatoberfläche eingebracht. Geeignete Techniken hierfür sind beispielsweise Ionenimplantation, Einlagerung in geeignete Elektolyten etc.

[0028] Für die Auswahl von geeigneten Adhäsions- und/oder Signalproteinen kann das bereits vorhandene umfangreiche Fachwissen bezüglich der zellulären/molekularen Bausteine und Mechanismen der Zell-Signalprotein-Interaktionen genutzt werden. Die Signalproteine (als systemisch zirkulierende Bestandteile, von Zellen lokal produziert oder in der extrazellulären Matrix gespeichert) treten durch die Molekularerkennung über zellmembranständige Rezeptoren in Wechselwirkung mit der Zelle. Für die Bindungsspezifität zwischen Rezeptor und Signalprotein sind die Aminosäuresequenzmotive in den Molekülen der Rezeptoren und Signalproteine verantwortlich. Wichtige Zellfunktionen (z. B. Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Substrat-Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Mineralisation) sind durch sequenzmotiv-spezifische Signalproteine selektiv aktivierbar. Beispiele von Sequenzmotiven für Zell-ECM-Adhäsion sind RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), REDV (Arginin-Glutamat-Aspartat-Arginin-Valin), YIGSR (Tyrosin-Isoleucin-Glycin-Serin-Arginin), VAPG (Valin-Alanin-Prolin-Glycin), VGVAPG (Valin-Glycin-Valin-Alanin-Prolin-Glycin), KQAGDV (Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Aspartat-Valin) HHLGGAKQAGDV (Histidin-Histidin-Leucin-Glycin-

Glycin-Alanin-Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Aspartat-Valin). An der Kontrolle der Zellfunktionen beteiligte Proteine sind unter anderem Bone Sialoprotein (BSP), Bone Morphogenic Proteins, Osteopontin (OP), Vitronectin, ICAM-1, VCAM, Hormone, Wachstumsfaktoren und dgl. Alle diese Sequenzmotive und Proteine bzw. deren Derivate und spezifischen Erkennungssequenzen können in den erfindungsgemäßen Beschichtungen eingesetzt werden.

[0029] Es wird für den Fachmann ersichtlich sein, daß nicht nur die natürlichen Proteine, sondern auch synthetische Derivate, die im wesentlichen die gleichen oder möglicherweise sogar optimierte funktionelle Eigenschaften aufweisen, in der Beschichtung der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können. Ein Vorteil von kurzen synthetischen Peptid-Derivaten kann z. B. darin bestehen, daß diese einen Sterilisationsprozeß, wie er vor der Inkorporation von Implantaten zwingend zu erfolgen hat, besser als natürliche Proteine überstehen, so daß die gewünschte Struktur bzw. Nativität der biologisch funktionalisierten Oberfläche auch nach der Sterilisation erhalten bleibt.

[0030] Zur Entwicklung solcher Derivate bieten sich beispielsweise die Methoden des Molecular Modelling, d. h., der Entwurf und die Testung von Molekülen durch Computersimulation in einer virtuellen Realität, an. Diese Technologie bietet auch für die Optimierung von Adhäsions- und Signalproteinen zur biologischen Funktionalisierung von Implantatmaterialien eine Reihe von Vorteilen. Erstens sind native Adhäsions- und Signalproteine kostenintensiv und in der Anzahl limitiert. Zweitens sind synthetische Produkte, welche die gleichen funktionellen Sequenzmotive, jedoch eine kürzere Kettenlänge aufweisen, stabiler gegen in vivo Degradation und Denaturierung. Zudem lassen sich die Modifizierung bekannter Molekülstrukturen und das Designen neuer Molekülstrukturen und deren Testung durch Computersimulation viel kostengünstiger und zielsicherer als die normalerweise anfallenden aufwendigen experimentellen Arbeiten durchführen.

[0031] Die Immobilisierung der Proteine/Peptide auf der Ca/P-Phase bzw. der darunterliegenden Substratoberfläche kann mittels von der Waalschen Wechselwirkung, Ionenbindung oder kovalenter Bindung erfolgen. Nach bisherigen Erkenntnissen wird eine kovalente Bindung oder Ionenbindung voraussichtlich eine bessere biologische Aktivität als die Bindung über von der Waalschen Kräfte ergeben.

[0032] Die optimale Methode in jedem Einzelfall wird jedoch unter anderem von der Art der beteiligten Bindungspartner, den sterischen Erfordernissen, der gewünschten Bindungsstärke etc. abhängen und kann vom Fachmann unschwer in Routineversuchen bestimmt werden.

[0033] Die kovalente Bindung von Proteinen/Peptiden an Trägeroberflächen über sogenannte Ankergruppen ist im Stand der Technik grundsätzlich bekannt, wenn auch meist nicht für die Beschichtung von Implantaten beschrieben. Entsprechende Verfahren können, erforderlichenfalls geeignet modifiziert, in analoger Weise angewandt werden. Beispielsweise können auf Metalloberflächen durch Silanisierung reaktive Gruppen eingeführt werden, welche dann mit geeigneten Ankergruppen, gegebenenfalls unter Verwendung von silanhaltigen Haftvermittlern, Bindungen eingehen können (vgl. z. B. DE OS 43 21 005). Die Proteine/Peptide werden dabei in der Regel über eine Amidbindung an eine zweite funktionelle Gruppe dieser Ankergruppen gebunden. Die Proteine/Peptide können auch durch Einführung einer zusätzlichen reaktiven Gruppe (z. B. Acrylat) funktionalisiert und durch Reaktion mit einer entsprechenden funktionellen Gruppe der Ankergruppen oder auf der, gegebenenfalls funktionalisierten, Substratoberfläche gebunden werden. Eine weitere Möglichkeit bei Metallober-

flächen besteht darin, durch Bedampfung mit Gold eine für Thiolreste von Ankergruppen reaktive Oberflächenschicht zu erzeugen (14).

[0034] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Bindung von Peptiden/Proteinen an Ca/P-Schichten bzw. -Phasen von besonderer Bedeutung. Es ist bekannt, daß Polyanionen, z. B. Peptide, die mehrere Aspartat- und Glutaminsäurereste enthalten, stark, jedoch reversibel, an Hydroxylapatit binden; dies ist die Grundlage der Hydroxylapatit-chromatographie. Chu und Orgel (15) beschreiben die Verwendung von Oligomeren von Glutaminsäure und D,L-2-Amino-5-phosphonopentansäure als Ankergruppen zur Bindung von Biotin an Hydroxylapatit. Analog dazu lassen sich die gewünschten Adhäsions- und Signalproteine bzw. -peptide unschwer mit diesen oder ähnlichen Oligomeren oder Kombinationen davon über Amidbindungen verknüpfen und an die jeweils vorliegende Ca/P-Phase immobilisieren. Die Ermittlung weiterer geeigneter Polyanionen liegt ohne weiteres im Rahmen der Fähigkeiten eines Durchschnittsfachmanns auf diesem Gebiet. Eine weitere Alternative besteht in der Aufbringung von Calciumphosphat-Dünnschichtfilmen mit darin inkorporierten Peptiden unter Einsatz von sich selbst organisierenden Monoschichten.

[0035] Ankergruppen können auch dazu verwendet werden, um den Abstand der Adhäsions- und/oder Signalpeptide von der Substratoberfläche zu optimieren. Untersuchungen zur Bindung der RGD-Zellerkennungssequenz an PMMA (Polymethylmethacrylat)-Oberflächen haben ergeben, daß in diesem Fall ein kritischer Mindestabstand von etwa 3,5 nm erforderlich ist, um eine sterisch erfolgreiche Zelladhäsion vollziehen zu können (12). Die optimalen Abstände werden in Abhängigkeit von der Struktur der Substratoberfläche und den eingesetzten Adhäsions- bzw. Signalpeptiden variieren, können jedoch vom Fachmann unschwer in Routineversuchen bestimmt werden. Die Herstellung von maßgeschneiderten Ankergruppen bestimmter Länge ist für den Fachmann ebenfalls eine Routineangelegenheit. Gerade die oben genannten Peptid-Oligomere lassen sich durch geeignete Wahl der Aminosäure-Monomere und der Anzahl der Monomere und gegebenenfalls durch Kombination mit weiteren Aminosäuren oder Peptiden bestimmter Länge leicht in jeder gewünschten Weise modifizieren.

[0036] Ankergruppen lassen sich auch vorteilhaft zur Anbindung und kontrollierten Freisetzung von Antibiotika und/oder anderen Arzneimittelwirkstoffen einsetzen. Erfindungsgemäß verwendbare Antibiotika sind beispielsweise Gentamicin, Rifampin, Mupirocin sowie andere dem Fachmann bekannte, übliche und geeignete Antibiotika.

[0037] Ein weiterer relevanter Gesichtspunkt für die optimale Gestaltung und damit Effizienz der erfindungsgemäßen Beschichtung ist auch die geometrisch/räumlich strukturierte Anordnung der Proteine/Peptide auf der Substratoberfläche. Sowohl die Orientierung der Peptidsequenzen als auch deren Konformation sowie die Oberflächendichte und Stabilität zum Substratmaterial beeinflussen die zu erwartende positive Aktivierung von Zellfunktionen maßgeblich. Die Optimierung dieser Parameter wird im Idealfall eine Simulation der natürlichen extrazellulären Matrix direkt auf der Implantatoberfläche ergeben.

[0038] Die biologisch funktionalisierte Beschichtung kann auch auf vorstrukturierten Matrixmaterialien aufgebracht werden, um die mechanische Verbindung zwischen Knochengewebe und Implantat noch weiter zu verbessern.

[0039] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne diese jedoch darauf zu beschränken.

BEISPIEL I

[0040] Ein Grundkörper aus einer Titanlegierung, Ti-Al₆V₄, wird mit einem plasmagespritzten Titan (TPS)-Zweischichtsystem in einer Gesamtdicke von 200–400 µm belegt. Die erste Schicht, welche porenfrei und dicht aufgebracht ist, sorgt für gute Haftung auf dem Implantatgrundkörper und wird dann mit einer zweiten plasmagespritzten Schicht belegt, welche einen Porenanteil von etwa 20–35% besitzt und offene bzw. interkonnektierende Poren eines mittleren Durchmessers von etwa 100–250 µm aufweist. Auf diese TPS-Schicht wird dann eine 10–20 µm dicke Ca/P-Phase elektrochemisch nach dem in der DE 44 31 862 beschriebenen Verfahren so abgeschieden, daß die Offenporigkeit des TPS-Zweischichtsystems erhalten bleibt. Die gebildete Ca/P-Schicht haftet gut auf der offenporigen metallischen Substratoberfläche. Das Ca/P-Verhältnis dieser Schicht, die im wesentlichen aus Brushit und Monetit besteht, beträgt etwa 1,0–1,20. In-vitro-Versuche in simulierter Knochenflüssigkeit gemäß DIN 10993 zeigen, daß die ursprünglich aufgetragene Ca/P-Schicht unter diesen Bedingungen bereits nach 7 Tagen fast vollständig degradiert und nach 14 Tagen praktisch nicht mehr nachweisbar ist. Bereits nach 2 Degradationstagen findet eine Phasenumbildung auf der Materialoberfläche statt und es kommt zur Präzipitation einer dünnen, nicht vollständig auskristallisierten Apatitschicht mit einem Ca/P-Verhältnis von etwa 1,40–1,50, in die punktuell Elektrolytbestandteile (Na, Si, und S) eingebaut sind.

[0041] Zellproliferations- und Zellvitalitätstests mit knochengewebstypischen Zellen (Osteoblasten) und unspezifischen Zellen (3T3-Fibroblasten) auf diesem Material und einem Referenzmaterial ohne Ca/P-Schicht zeigen, daß die schnelle Degradation der ursprünglichen Ca/P-Phase unter gleichzeitiger Präzipitation von phasen-veränderten Ca/P-Strukturen zur Stimulierung der Zellproliferation, Zellvitalität und Kollagen Typ-I-Synthese bei Osteoblasten beiträgt, während die unspezifischen 3T3-Fibroblasten nicht stimuliert werden.

BEISPIEL II

[0042] Eine Ca/P-beschichtete Implantatoberfläche wird hergestellt wie in Beispiel I beschrieben. Die Peptide RGD und YIGSR werden mit dem Dekamer von Glutaminsäure in einem herkömmlichen Festphasen-Peptidsyntheseschritt verknüpft und anschließend an die Ca/P-Phase adsorbiert. Dabei werden negativ geladene Polypeptide als Linker zur Anbindung von Liganden an die CaP-Oberflächen verwendet. Die so hergestellten biologisch funktionalisierten Beschichtungen werden dann den gleichen Degradationstests und Zellproliferationstests unterworfen wie in Beispiel I beschrieben.

[0043] Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die erfindungsgemäße, mit Adhäsions- und/oder Signalproteinen funktionalisierte Oberfläche die Zellfunktionen molekular-selektiv kontrollieren und dementsprechend gewünschte zelluläre Reaktionen triggern bzw. optimieren kann. Die Kombination einer kontrolliert resorbierbaren CaP-Schicht mit integrierten Adhäsions- bzw. Signalproteinen ermöglicht es, eine langzeitstabile und beschleunigte Osteointegration von Implantatoberflächen zu erreichen. Die resorbierbare CaP-Phase unterstützt dabei insbesondere den Prozeß der Knochenmineralisation durch die Bereitstellung von Ca und P für die Neubildung der anorganischen Knochenphase. Die simultane Wirkung beider Komponenten ergibt so eine neue Qualität positiv bioaktiver und metabolisch induktiver Implantatoberflächen bzw. Medical Devices. Die

Implantat-induzierten, bakteriellen Infektionen (septische Prothesenlockerung) können durch die Anbindung bzw. kontrollierte Freisetzung von geeigneten Antibiotika direkt von der Implantatoberfläche vermieden werden.

Literaturverzeichnis

- (1) DE GROOT, KLEIN, WOLKE Plasma-sprayed coatings of calcium phosphate CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 1990
- (2) DE GROOT, KLEIN, WOLKE Chemistry of calcium phosphate bioceramics CRC Handbook of bioactive ceramics, 2, 1996, S. 3-16
- (3) BAN, MARUNO Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid Biomaterials, 19, 1998, 1245-1253
- (4) DE 44 31 862 C2 Verfahren zur Beschichtung von Metall- und Keramikoberflächen mit Hydroxylapatiten
- (5) WHEELER Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite - coated cylinder implants International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 11, 3, 1996, 340-350 Biomedizinische Technik, 40, 1, 1995, S. 377-378
- (6) OSHBORN Die biologische Leistung der Hydroxylapatitkeramik-Beschichtung auf dem Femurschaft einer Titanendoprothese - erste histologische Auswertung eines Humanexplantats Biomedizinische Technik, 32, 1987, 177-183
- (7) EVANS, CLARKE-SMITH Studies on the mechanism of cell damage by finely ground hydroxyapatite particles in vitro Clinical Materials, 7, 1991, 241-245
- (8) SHENG SUN, HWEL TSUANG, SHONG CHANG Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts Biomaterials, 18, 1997, 683-690
- (9) COOLEY, VAN DELLE, BURGESS, WINDELER The advantages of coated titanium implants prepared by radiofrequency sputtering from hydroxyapatite J. Prosthet. Dent., 67, 1992, 93-100
- (10) MAXIAN, ZAWADSKI, DUNN Effect of CaP coating resorption and surgical fit on the bone/implant interface Journal of Biomedical Material Research, 28, 1994, 1311-1319
- (11) GRONOWICZ, MCCARTHY, J. Orthopaedic Res., 14, 1996, 878
- (12) KANTLEHNER, FINSINGER, MEYER, SCHAFFNER, JONCZYK, DIEFENBACH, NIES, KESSLER Selective RGD-mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants Angew. Chem. Int. Ed., 38, 4, 1999, 560-562
- (13) MANN, TSAI, WEST Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix Deposition Biomaterials, 20, 1999, 2281-2286
- (14) HEUVEL Analytical Biochem., 21, 1993, 223
- (15) CHU, ORGEL Bioconjugate Chem., 8, 1997, 103-105
- (16) DE 197 55 801 A1 Mit der Zelladhäsion vermittelnden Peptiden beschichtete Implantate und Verfahren zur ihrer Herstellung
- (17) HING, KA, GIBSON, IR, REVELL, PA, BEST, SM, BONFIELD, W. Influence of Phase Purity on the in vivo Response to Hydroxyapatite Proceedings of the 13th Symposium on Ceramics in Medicine, Bologna, Italy, 22.11.-26.11.2000, 373-376
- (18) MALCHAU, H, HERBERTS, P. Prognose der totalen Hüftarthroplastik (THA) 63. Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, Atlanta, USA, Februar 22-26, 1996
- (19) ROBERTSSON, O, KNUTSON, K, LEWOLD, S, LLDGREN, L. The Swedish Knee Arthroplasty Register:

Outcome with special emphasis on 1988-1997 Handout Scientific Exhibition AAOS, San Francisco, 2001

Patentansprüche

1. Biologisch funktionalisierte und metabolisch induktive Beschichtung, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf eine offenporige Substratoberfläche eine oder mehrere kontrolliert resorbierbare Ca/P-Phase(n) kombiniert mit Adhäsions- und/oder Signalproteinen und/oder mit funktionellen Derivaten davon in einer Schichtdicke, welche die Offenporigkeit der Substratoberfläche im wesentlichen nicht beeinträchtigt, aufgebracht ist.
2. Beschichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die offenporige Substratoberfläche durch eine Plasmaspritz-, Sinter- oder Gießtechnik hergestellt wurde.
3. Beschichtung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die offenporige Substratoberfläche eine plasmagespritzte Titanschicht (TPS) ist, die als Einschicht- bzw. Zweischichtsystem ausgebildet wurde.
4. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ca/P-Schicht(en) ein Ca/P-Verhältnis von etwa 1,0 bis etwa 1,8 aufweist(en).
5. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ca/P-Schicht mit Elementen des natürlichen Knochenapats, z. B. Na, Mg, Si, F etc., dotiert ist.
6. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Adhäsions- und/oder Signalproteine bzw. deren funktionelle Derivate auf der Ca/P-Phase immobilisiert sind.
7. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Adhäsions- und/oder Signalproteine bzw. deren funktionelle Derivate ganz oder teilweise direkt auf der offenporigen Substratoberfläche immobilisiert sind.
8. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als geometrische Struktur, die aus Adhäsions- und/oder Signalproteinen bzw. deren funktionellen Derivaten und Ca/P-Phasen aufgebaut ist, auf der Substratoberfläche vorliegt.
9. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-8, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie auf einer vorstrukturierten Substratoberfläche aufgebracht ist.
10. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Adhäsions- und/oder Signalproteine bzw. deren funktionelle Derivate eines oder mehrere der Sequenzmotive RGD, REDRV, YIGSR, VAPG, VGVAPG, KQAGDV, HLGAK-QAGDV aufweisen.
11. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Adhäsions- und/oder Signalproteine aus der Gruppe, bestehend aus Bone Sialoprotein (BSP), Bone Morphogenic Proteins, Vitronectin, Osteopontin (OP), ICAM-1, VCAM oder funktionellen Derivaten bzw. spezifischen Sequenzmotiven davon, ausgewählt sind.
12. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Adhäsions- und/oder Signalproteine bzw. deren funktionellen Derivate über Ankergruppen mit der Substratoberfläche und/oder der Ca/P-Phase verknüpft sind.
13. Beschichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den Ankergruppen um ein- oder mehrlagige Polyelektrolyte, Tetraetherlipide

oder Oligomere von Glutaminsäure, Asparaginsäure oder D,L-2-Amino-5-phosphonopentansäure oder Derivate davon handelt.

14. Beschichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Ankergruppen auch die Funktion von Spacern erfüllen. 5

15. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß die CaP-Beschichtung eine Schichtdicke von 1-50 µm aufweist.

16. Biologisch funktionalisierte Beschichtung, dadurch gekennzeichnet, daß die Elemente Ca und P sowie gegebenenfalls andere, dem biogenen Knochenapatit eigene Elemente, wie z. B. Na, Mg, Si, F etc., direkt in eine strukturierte, metallische Implantatoberfläche eingebracht sind. 15

17. Biologisch funktionalisierte Beschichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die gewünschten Elemente, z. B. Ca, P, Na, Mg, Si, F, mittels Ionenimplantation oder Einlagerung in geeignete Elektrolyte in eine strukturierte metallische Implantatoberfläche eingebracht sind. 20

18. Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß in die Beschichtung auch Antibiotika und/oder andere Arzneimittelwirkstoffe inkorporiert sind. 25

19. Beschichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Antibiotika und/oder anderen Arzneimittelwirkstoffe über Ankergruppen an die Substrat- bzw. Implantatoberfläche gekoppelt sind und gegebenenfalls kontrolliert davon freisetzbar sind. 30

20. Implantat, gekennzeichnet durch eine biologisch funktionalisierte Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-19.

21. Implantat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Implantate im Knochenkontakt, z. B. Dental-, Gelenk- oder Wirbelsäulenimplantate, Nägel für die Traumatologie, handelt. 35

22. Verfahren zur Herstellung einer Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-19.

23. Verwendung der Beschichtung nach einem der Ansprüche 1-19 für Implantatoberflächen, insbesondere von Dental- oder Gelenkimplantaten. 40

45

50

55

60

65

- Leerseite -